

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-287585
(43)Date of publication of application : 27.10.1998

(51)Int.CI. A61K 39/395
A61K 39/395
A61K 35/74
A61K 39/40

(21)Application number : 09-094159 (71)Applicant : GEN CORP:KK
NISSHIN FLOUR MILLING CO
LTD
(22)Date of filing : 11.04.1997 (72)Inventor : KODAMA YOSHIKATSU
IKATORO FUASUCHINO
KIMURA NOBUTAKE
ARIGA MASATO

(54) PREVENTING AGENT AND THERAPEUTIC AGENT FOR GASTRITIS, GASTRIC ULCER AND DUODENAL ULCER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To enable a prevention of colonization of Helicobacter pylori(Hp) on a gastric membrane and obtain a preventing and therapeutic agent for gastritis, gastric and duodenal ulcers by using a chicken egg antibody against the Hp as an antigen.

SOLUTION: This preventing and therapeutic agent is obtained by immunizing a chicken with a urease and a flagellum of Helicobacter pylori(Hp) as an antigen and providing an antibody specific for the antigen from an egg produced by the immunized chicken. A composition capable of preventing the proliferation of the Hp in the stomach is prepared by including each or both of the antibodies therein. The resultant composition can be utilized as a preventing and therapeutic agent and a preventing food for the diseases caused by infection, with the Hp. The specific antibody can be used together with lactic acid bacteria, enterococci, yeasts or bacteria of the genus Bacillus. Since the antibody is obtained by using the chicken egg, the objective specific antibody can be obtained in a large amount at a low cost by simple means.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-287585

(43)公開日 平成10年(1998)10月27日

(51)Int.Cl.⁶
A 61 K 39/395
35/74
39/40

識別記号
A D Z
A C L

F I
A 61 K 39/395
35/74
39/40

A D Z D
A C L N

(21)出願番号 特願平9-94159
(22)出願日 平成9年(1997)4月11日

(71)出願人 000129976
株式会社ゲン・コーポレーション
岐阜県岐阜市折立296番地1
(71)出願人 000226998
日清製粉株式会社
東京都千代田区神田錦町1丁目25番地
(72)発明者 ▲児▼玉 義勝
岐阜県岐阜市佐野839番地の1 株式会社
ゲン・コーポレーション免疫研究所内
(72)発明者 イカトロ, ファウスチノ
岐阜県岐阜市佐野839番地の1 株式会社
ゲン・コーポレーション免疫研究所内
(74)代理人 弁理士 広瀬 章一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 胃炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍の予防剤並びに治療剤

(57)【要約】

【目的】 ヘリコバクター・ピロリ感染により生じる胃
炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍に対する有効で安全な予
防剤、治療剤、および予防用食品を提供する。

【構成】 ヘリコバクター・ピロリのウレアーゼを抗原
として鶏に免疫して得られた特異的鶏卵抗体、および/
またはヘリコバクター・ピロリの鞭毛を抗原として鶏に
免疫して得られた特異的鶏卵抗体を含有する組成物。こ
の組成物は胃においてヘリコバクター・ピロリを完全に
除菌することができ、胃炎、胃潰瘍または十二指腸潰瘍
に対する予防剤および治療剤、ならびに予防用食品とし
て有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヘリコバクター・ピロリのウレアーゼを抗原として鶏に免疫し、この免疫鶏が産生した卵から得た、前記抗原に特異的な抗体。

【請求項2】 ヘリコバクター・ピロリの鞭毛を抗原として鶏に免疫し、この免疫鶏が産生した卵から得た、前記抗原に特異的な抗体。

【請求項3】 請求項1記載の抗体もしくは請求項2記載の抗体、またはその両者を含有する、ヘリコバクター・ピロリの胃での増殖を阻止しうる組成物。

【請求項4】 請求項1記載の抗体もしくは請求項2記載の抗体、またはその両者を有効成分として含有する胃炎、胃潰瘍または十二指腸潰瘍に対する予防剤および治療剤。

【請求項5】 請求項1記載の抗体もしくは請求項2記載の抗体、またはその両者を含有する胃炎、胃潰瘍または十二指腸潰瘍の予防用食品。

【請求項6】 (1) 請求項1記載の抗体および(2) 乳酸菌、腸球菌、酵母もしくはバチルス属細菌を含有する、ヘリコバクター・ピロリの胃での増殖を阻止しうる組成物。

【請求項7】 (1) 請求項1記載の抗体および(2) 乳酸菌、腸球菌、酵母もしくはバチルス属細菌を有効成分として含有する胃炎、胃潰瘍または十二指腸潰瘍に対する予防剤および治療剤。

【請求項8】 (1) 請求項1記載の抗体および(2) 乳酸菌、腸球菌、酵母もしくはバチルス属細菌を含有する胃炎、胃潰瘍または十二指腸潰瘍の予防用食品。

【請求項9】 (1) 請求項1記載の抗体、(2) 請求項2記載の抗体、および(3) 乳酸菌、腸球菌、酵母もしくはバチルス属細菌を含有する、ヘリコバクター・ピロリの胃での増殖を阻止しうる組成物。

【請求項10】 (1) 請求項1記載の抗体、(2) 請求項2記載の抗体、および(3) 乳酸菌、腸球菌、酵母もしくはバチルス属細菌を有効成分として含有する胃炎、胃潰瘍または十二指腸潰瘍に対する予防剤および治療剤。

【請求項11】 (1) 請求項1記載の抗体、(2) 請求項2記載の抗体、および(3) 乳酸菌、腸球菌、酵母もしくはバチルス属細菌を含有する胃炎、胃潰瘍または十二指腸潰瘍の予防用食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ヘリコバクター・ピロリの感染によって引き起こされる胃炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍を効果的に予防または治療しうる経口予防剤、治療剤に関する。さらに胃炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍の予防用食品にも関する。

【0002】

【従来の技術】 現在、消化性潰瘍の根治的治療にはヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) の除菌が不

可欠であると考えられており、その除菌療法としては以下に説明するように抗生物質と胃酸分泌抑制剤との併用療法が広く提唱されている。

【0003】 ヘリコバクター・ピロリは、一端に数本の鞭毛 (flagella) を持つ、らせん型をしたグラム陰性桿菌で、ヒトの胃粘膜に生息する菌である。この菌は、1983年オーストラリアのMarshall, B. J. とWarren, J. R. によって胃炎、胃潰瘍患者の胃生検材料から高率に検出されることが報告された。当時は形態および増殖性状からカンピロバクターに類似していたので、カンピロバクター・ピロリ (*Campylobacter pylori*) と命名された。その後、外膜の脂肪酸組成やリボソームの16S-RNA配列の相同性がカンピロバクターと大きく相違していることが分かり、新たにヘリコバクター属が設けられて、今日、この菌はヘリコバクター・ピロリ (以下、H pと略称することがある) と呼ばれている。

【0004】 以来、疫学的研究から、この菌は胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍の起因菌であり、さらには胃癌などの疾患と関連があるとの報告が相次いで発表されてい

る。H pが一旦胃粘膜に定着すると、感染に対する免疫応答が強い (抗体価が高い) にもかかわらず、除菌されず胃内に生息し続ける。そのため、抗生物質による治療によって完全に除菌できない限り、投薬を中止すると約1ヵ月以内に治療前の感染状態に戻ってしまう。しかも胃内は酸度の高い塩酸によってpHが非常に低く保たれているので、多くの抗生物質は不活性化される。このような理由で、H pの除菌には、胃酸分泌を強力に抑制するプロトンポンプインヒビターと除菌薬 (抗生物質) が併用の形でしばしば常用量を超える量で使用されている。また、現状ではH pの除菌には次サリチル酸ビスマス (bisaluth subsalicylate)、メトロニダゾールおよびテトラサイクリンの新3剤併用療法が最も高い除菌率を示すことが分かっているが、この併用に使うメトロニダゾールは単独で使用すると耐性発現が急速に起こることが知られている。発展途上国では下痢患者に対してこの薬剤が広く使用された結果、メトロニダゾールに耐性のH p感染が高率で生じているとの報告もある。

【0005】 このように、抗生物質の長期投与は、その副作用に加え、耐性菌の増加という非常に重大な問題が危惧される。

【0006】 除菌を目的とした抗生物質の投与による副作用および耐性菌の増加などの問題を解決する方法として、現在、経口ワクチンによる免疫療法のアプローチが見られる。しかし、この目的の達成には、H pに対する感染モデル動物の作出が必須の条件である。これまでに、ラット、マウス、ウサギ、イヌ、ブタ、サル等を用いてH pの感染試験が試みられ、イヌ、ブタ、サルにおいて成功したことが報告されている。しかしながら、マウスやラット等の小動物には感染が容易に成立せず、そのため無菌動物を用いなければならなかったり、また、

感染を長期間持続させるには新鮮分離株を用いる必要があるなどの複雑な条件が障害となって、新しい予防、治療法の確立を目指した研究はほとんど進展していない。

【0007】例えば、Marchetti,M 等のScience, Vol. 267, 1655-1658頁(1995年)には、H_p経口ワクチンの効果の検討にマウスのモデルを用い、経口免疫によりH_pの感染が80%阻止されたことが記載されている。しかし、この経口ワクチンではアジュバントとして大腸菌由来の易熱性毒素(LT)を加えている。一般に、このような経口ワクチンの実験では、アジュバントとして大腸菌由来のLTの他にコレラトキシンを加えることが普通であり、これらのアジュバントなしでは粘膜免疫は成立しない。実用化への問題点として、大腸菌のLTもコレラトキシンも毒性のレベルが非常に高く、ヒトへの応用に関して安全性の面で多くの未解決な問題点を抱えている。また、ワクチンはあくまで予防を主体とするものであり、

一旦H_pが感染した患者に対しては効果は望めない。

【0008】そこで、H_p制御の新しい試みとして、相場等(第30回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会、日程と抄録第22頁、要望演題18 *Helicobacter pylori*制御の新しい試み、1997年1月)は、無菌マウスを用いたH_p感染モデルで、①プロバイオテックスとしてのラクトバチルス・サリバリウス(*Lactobacillus salivarius*)投与によるH_p制御効果、②H_pのホルマリン全菌体死菌を鶏に免疫し、卵黄に移行した抗H_p抗体の経口投与によるH_pの制御効果の可能性を検討している。その結果、①H_p感染マウスの胃内のH_p菌数に対するL.サリバリウスの除菌効果に関しては、対照群と比較して投与群のH_p菌数が1/10~1/1,000まで低下した、②抗体投与群では対照群に比較して胃内H_p菌数は1/10程度に低下したと報告されている。

【0009】しかしながら、この結果は、口腔、胃および腸管内に常在菌叢不在のマウスを用いて得られたものであり、常在菌叢を保有している通常マウスにおいてもこのような結果が得られるとは限らない。通常、マウス固有の常在菌叢を有するマウスにヒト由来の乳酸菌を接種しても常在菌叢によって排除され、定着しないのが常である。また、抗体はH_pの全菌体に対する抗体を用いており、抗体投与群においてH_pの胃内菌数が1/10程度に低下したに過ぎず、完全除菌にまで至っていない。しかもH_p菌数の低下と胃炎軽減効果との関連については記載されていない。

【0010】特異的抗体の使用に関しては、特開平4-275232号公報にも開示があるが、これにはH_p全菌体を抗原として得られた鶏卵抗体が記載されているにすぎない。すなわち、この公報には、H_p全菌体を抗原として免疫した鶏の卵から調製した該抗原に特異的な抗体を有効成分とする胃炎、胃または十二指腸潰瘍予防食品が開示されているが、その効果は明らかではない。上記公報においては、得られたH_p全菌体に対する抗体の有効性

を、インビトロの系で豚胃粘膜ムチンにH_pが付着することを利用して評価し、その結果、H_p全菌体に対する鶏卵抗体が胃粘膜へのH_pの付着を阻止したと記載されている。しかし、このインビトロ試験はpH7.4の非常に温和な環境下で行われているため、得られたデータが実際に胃内というpH1~3の強酸性環境の影響を正確に反映しているかどうかは疑問である。強酸性の胃内での除菌の効果を確認するにはH_p感染モデル動物を用いることが必要であるが、上記公報にはそのような実験の記載はなく、従ってH_p全菌体に対する鶏卵抗体の投与が、胃内でのH_pの除菌を促すかどうかは不明である。さらに、胃炎の発生を抑制しうるかどうかについては全く記載されていない。

【0011】また日本農芸化学会誌、講演要旨集、71, 52頁、20p22(1997)にも、H_p全菌体に対する鶏卵抗体がH_p制菌作用を有するとの記載があるが、この場合も、鶏を免疫するための抗原はH_p全菌体であり、上記の鶏卵抗体と同様の問題を有すると考えられる。

【0012】なお、H_p全菌体に対する抗体をウシなどの哺乳動物の乳汁や血液から得ることが特開平4-169539号公報および特開平4-330099号公報に開示されているが、このような方法では大量に安価に抗体を製造することはできない。しかも、哺乳動物の免疫に用いる抗原が全菌体であるので、上記従来技術と同様、完全な除菌は期待できない。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】上述のように、H_pを除菌するために、抗生物質を長期にわたり使用すると副作用と共に耐性菌の増加の懼れがあり、また、ワクチンは実用化には至っていない。さらに、乳酸菌を接種する試み、あるいはH_p全菌体に対する鶏卵抗体を使用する試みでは、H_pを完全に除菌することができず、従つて、胃炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍の発生予防、また治療に有効であるとは言えない。

【0014】本発明の目的は、抗生物質の使用に伴う副作用や耐性菌増加という欠点を持たず、ヘリコバクター・ピロリ感染によって引き起こされる胃炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍に対して、効果的で安全性の高い予防剤および治療剤、並びに予防用食品を提供することである。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、これまで十分に解明されていなかった、ヘリコバクター・ピロリの胃粘膜への定着に関し、新規な重要な知見を得たことに基づき本発明に至った。

【0016】H_pは嫌気的条件および大気中では増殖せず、微好気的条件下でのみ増殖するなどの増殖条件の特殊性から、本菌の胃内での生態に関しては十分に解明されていなかった。特に、強酸性の胃内での増殖の難となる胃粘膜への定着に関して種々の研究がなされているに

もかかわらず、胃内での強い増殖能力の理由ははっきりと説明できなかった。胃粘膜への定着は、胃内でのH_pの増殖に重要な役割を果たすものであるので、定着因子の解明は、H_pにより引き起こされる胃炎、消化性潰瘍の予防、治療法の開発に大きな意義をもつ。

【0017】胃内でのH_pの病原因子としては、これまで、H_pの產生するウレアーゼ、胃粘膜ムチン層を自由に遊走するための鞭毛、炎症性サイトカインとしてのインタロイキン8の產生に関与するとされるCag A外膜蛋白、胃粘膜上皮細胞の空胞化・びらん・壊死および潰瘍形成に関与するVac A空胞化細胞毒などが考えられている。

【0018】病原因子の1つであるH_pが產生するウレアーゼについては、胃内の尿素をアンモニアに変換することにより菌体周辺の強酸性生育環境を中和し、H_pが胃内で増殖するためのよい環境を提供するのに役立つと考えられていた。一方、胃粘膜へのH_pの定着に関しては、ノトバイオート豚を用いた実験では、ウレアーゼ產生株ばかりではなく、非產生株でも同程度に胃内に定着することが明らかになっている(Eaton, K. A. and Krakowka, S. 1995, Scand. J. Gastroenterol. 30:434-437)。また最近の報告では、ヒトの胃粘膜上皮細胞並びに胃癌株化細胞(Kato III)に対するH_pのウレアーゼ產生と非產生株の付着能について検討されているが、その結果は、両株のこれらの細菌に対する付着能に差異はなく、H_pのウレアーゼは付着因子(adhesin)としての機能は持たないと結論づけられた(Clyne, M. and Drumm, B. 1996, Infect. Immun. 64:2817-2820)。

【0019】本発明者らは、H_pの定着に関する従来の研究結果からは予想外の、ウレアーゼそのものがH_pの胃粘膜への定着に関与するとの知見を得た。すなわち、H_pの產生するウレアーゼは、尿素をアンモニアに変換する酵素としての作用に加え、定着因子としての作用が大きいこと、すなわちウレアーゼ自体が胃粘膜ムチンに結合することによりこの菌の増殖が可能となることを見出した。また、本発明者らは、H_pの鞭毛についても、胃粘膜への定着に関与していることを示唆する知見を得た。

【0020】本発明は上記知見に基づいてなされたものであり、H_pの胃粘膜への定着を完全に阻止するためには、H_pの全菌体に対する抗体では不十分であり、H_pのウレアーゼおよび／または鞭毛に対する抗体が有効であることを見出した結果なされたものである。さらに本発明者らは、これらの抗体と、乳酸菌、腸球菌、酵母またはバチルス属細菌との併用が相乗効果を有することも見出し、本発明を完成了。

【0021】すなわち、本発明の要旨は、ヘリコバクター・ピロリのウレアーゼを抗原として鶏に免疫し、この免疫鶏が產生した卵から得た、前記抗原に特異的な抗体、およびヘリコバクター・ピロリの鞭毛を抗原として

鶏に免疫し、この免疫鶏が產生した卵から得た、前記抗原に特異的な抗体にある。また、これらの抗体のそれぞれあるいは両者を含有する、ヘリコバクター・ピロリの胃での増殖を阻止しうる組成物にも関する。

【0022】さらに、本発明は(1)ヘリコバクター・ピロリのウレアーゼに対する特異的鶏卵抗体および(2)乳酸菌、腸球菌、酵母もしくはバチルス属細菌を含有する、ヘリコバクター・ピロリの胃での増殖を阻止しうる組成物、また、(1)ヘリコバクター・ピロリのウレアーゼに対する特異的鶏卵抗体、(2)ヘリコバクター・ピロリの鞭毛に対する特異的鶏卵抗体、および(3)乳酸菌、腸球菌、酵母もしくはバチルス属細菌を含有する、ヘリコバクター・ピロリの胃での増殖を阻止しうる組成物にも関する。

【0023】上記組成物は、胃炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍に対する予防剤並びに治療剤として使用でき、また胃炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍予防食品として用いえることもできる。

【0024】以下に本発明を詳細に説明する。
20 【0025】本発明の抗体含有組成物を得るには、まず、産卵鶏に免疫するための抗原としてH_pのウレアーゼまたは鞭毛を調製する。抗原の調製に用いるH_pの菌株としては例えば#130(Cag A+) (Vac A+)、NSP#305(Cag A+) (Vac A+)、NSP#335(Cag A+) (Vac A+)、NSP#355(Cag A-) (Vac A-) 等のヒト臨床分離株が挙げられる。これらの菌株を培養後、適宜手段によりウレアーゼ成分および鞭毛成分をそれぞれ調製する。

【0026】産卵鶏への免疫は、各抗原を所望により免疫増強剤(アジュバント)と共に鶏に接種することにより行う。この接種は皮下注射、筋肉注射などの方法が可能である。抗原の接種量は、使用抗原の種類および免疫増強剤の種類に応じて、目的とする特異的抗体が体内に適当量形成され、しかも鶏に対して過度の毒性が発揮されないように決定する。通常は、抗原の投与から数週以内に鶏の体内に投与した抗原に特異的な抗体が形成され、その鶏が產生する卵、特に卵黄にこの抗体が含まれるようになる。なお、抗原の接種は数回に分けて行うことができ、また高力価が持続するように追加接種することもできる。

40 【0027】鶏卵中の抗体価は、既知の測定方法、例えばELISAや凝集反応を用いる方法により測定できる。

【0028】これらの方法によって鶏卵中に抗体が適当量生成したことが確認できた後、鶏卵を採取し、目的とする特異的抗体を回収する。本発明の抗体含有組成物としては、全卵もしくは卵黄をそのまま用いてもよいし、また全卵もしくは卵黄からスプレードライ法や凍結乾燥法などにより粉末化したものでもよい。あるいは、卵黄からヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ポリエチレングリコールなどを用いる方法により卵黄脂質成分を除去した後粉末化したもの、さらに硫酸アンモ

ニウム塩析、硫酸ナトリウム塩析、低温エタノール沈殿法等の既知の蛋白質精製法により精製したものなど、種々の形態のものを目的に応じて使用することができる。

【0029】このようにして得られた、*H p*のウレアーゼに対する特異的抗体および*H p*の鞭毛に対する特異的抗体は、以下の実験例で実証したように、*H p*感染モデル動物において、胃粘膜に付着している*H p*をほぼ完全に除菌し、胃炎の発生を抑制するという効果を有する。すなわち、これらの抗体は*H p*の胃粘膜への付着を防止して、胃での増殖を完全に抑えることができる。このような優れた効果は従来の全菌体に対する抗体では得られなかつたものである。しかも、鶏卵を用いて得た抗体は、哺乳動物由來の抗体よりも優れた除菌効果を示す。

【0030】さらに、抗ウレアーゼ抗体と抗鞭毛抗体を併用した場合、あるいはこれらの抗体と乳酸菌、腸球菌、酵母もしくはバチルス属細菌を併用した場合には、菌体の力値が多少低い場合でも併用による相乗効果により優れた*H p*除菌効果および胃炎抑制効果を示した。

【0031】従って、本発明で得られる、*H p*ウレアーゼまたは*H p*鞭毛に対する特異的抗体は、単独でもしくは併用して、あるいは乳酸菌、腸球菌、酵母もしくはバチルス属細菌と併用して、胃炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍の予防剤、または治療剤として用いることができる。さらには、食品に添加することにより胃炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍の予防用食品としても利用できる。その際、抗体含有組成物は、全卵や卵黄をそのままあるいは精製して、液状または粉末状として用いることができる。

【0032】使用できる乳酸菌としてはラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・ギャセリ、ラクトバチルス・クリスピータスなどがある。腸球菌としてはエンテロコッカス・フェカリース、エンテロコッカス・エシウムなどが、酵母としてはイースト、カンジダ属のものが、バチルス属細菌としてはバチルス・ズブチリス等が例示できる。

【0033】予防剤、治療剤として用いる場合は、本発明の特異的抗体を主剤とし、これに制酸剤（炭酸水素ナトリウム、炭酸マグネシウム、沈降炭酸カルシウム、合成ヒドロタルサイト等）、胃粘膜保護剤（合成ケイ酸アルミニウム、スクランブルファート、銅クロロフィリンナトリウム等）や消化酵素（ビオジアスターーゼ、リバーゼ等）を加えてもよい。製剤化は既知の方法で行えばよい。本発明の予防剤、治療剤は経口により投与され、投与量は精製した鶏卵抗体として、予防の場合には成人1日当たり0.25～25.0mg/kg、治療の場合で成人1日当たり1.25～125mg/kgの範囲が好ましい。

【0034】胃炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍の予防用食品の場合は、精製した鶏卵抗体として食品中0.01～0.1重量%、好ましくは0.05重量%程度含まれるよう添加する。

【0035】次に、本発明を実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明はそれらによって制限されるものではない

【0036】

【実施例】

【0037】

【実施例1】

(1) *H p*抗原の調製

ア. 全菌体抗原の調製

10 胃炎患者由来の*H p*#130株（東海大学医学部生体防御機構系感染症学部門より分与）を5%馬血液加ブレインハートインフュージョン寒天培地に接種した後、ガスパック嫌気性ジャーで37℃72時間培養した。培養終了後、弱いα溶血を示すスムーズで透明な光沢のあるコロニーを釣り、1～10%牛胎児血清加ブルセラプロースに浮遊し、気相を10%CO₂、10%H₂および80%N₂混合ガスと置換して37℃で24～48時間振とう培養した。継代ごとに培養液量を増やし、4代まで継代培養した。各培養液については、継代ごとにグラム染色性、運動性、ウレアーゼ、カタラーゼおよびオキシダーゼ産生能を確認した。4代継代した培養液(5.2×10⁸ CFU/ml)を12,000×gで20分間遠心し、その菌体を出発培養液量の約1/100になるように滅菌精製水に浮遊した後、超高速ホモゲナイザー（キネマティカ社製）で15,000rpm 60秒間処理することにより菌体を可溶化した。菌体が破碎されたかどうかは、破碎物を10%馬血液加寒天培地に接種し、菌の発育の有無によって判定した。

【0038】イ. 鞭毛抗原の調製

上記と同様にして培養して得たブルセラプロース培養菌液(4.0×10⁸ CFU/ml)を12,000×gで20分遠心し、得られた菌体を精製水に溶解し、ポルテックスマキサーで攪拌することによりウレアーゼ成分を除去した。その後、菌体をトリス塩酸緩衝液(pH7.2)に浮遊し、菌体を超高速ホモゲナイザー（キネマティカ社製）で15,000rpm 60秒間処理した。さらに、この菌体を6,700×gで6分間遠心することにより鞭毛と菌体に分けた。鞭毛を含む上清にトリプシン（1mg/ml）を加え、37℃で20分間処理することにより混在するウレアーゼ等の蛋白成分を除去した。鞭毛を含む成分を25～60%のショ糖密度勾配に重層し、90,000×gで22時間遠心した(+4℃)。その後、フラクションコレクターで分取し、各分画の蛋白濃度をデンシシトメーターを用いてモニターするとともに、SDS-PAGEで鞭毛の所在を検討した。それに基づき、50kDa前後の蛋白を含む分画をプールし、精製水で3～10倍に希釈した後、180,000×gで60分間遠心することによりベレットを得た。さらに、これを精製水で溶解し、6,700×gで2分間遠心を行い、上清についてSDS-PAGEを実施したところ、鞭毛 A(53 kDa)および鞭毛 B(54 kDa)からなることを確認した。

【0039】ウ. ウレアーゼ抗原の調製

上記アと同様にして培養して得たブルセラプローズ培養菌液(3.5×10^8 CFU/ml)を $12,000 \times g$ で20分間遠心した後、ペレットを精製水に溶解し、ポルテックスミキサーで60秒間処理した。再び遠心し、ウレアーゼを含む抽出上清液を得た。精製は以下に示した方法によって行った。緩衝液(20mM リン酸塩、pH6.8, 1mM EDTA, 1mM 2-メルカプトエタノールおよび10% PEG 300)で平衡化したDEAE-セファセルカラムに上記抽出液をアプライし、0.5ml/分の流速でゲルに吸着させた。溶出は0~0.5M KClの濃度勾配によって実施した。各分画液についてウレアーゼ活性をモニターした。ウレアーゼ活性のピークが認められた分画をプールし、濃縮した。

【0040】次に、緩衝液(20mM リン酸塩、pH6.8, 150 mM NaCl)で平衡化したセファクリルS-300カラムに、上記濃縮液をアプライし、溶出した。各分画液のウレアーゼ活性を測定し、ウレアーゼ活性のピークを各々プールし、SDS-PAGEで分析したところ、ウレアーゼ A(32kDa)とウレアーゼ B(60kDa)の蛋白からなることを確認した。

【0041】(2) 産卵鶏への免疫

免疫には18週齢前後の白色レグホン種、ハイラインW77系群を用いた。実施例1で得られた3種の抗原(蛋白量を0.5~1.0mg/mlに調整)を別々に油性アジュバントと混和した後、左右の胸筋内に0.5 mlずつ注射した(初回免疫)。その6週後にブスターとして同量の抗原を各々免疫し、卵黄中の抗体価が有意に上昇して安定した、ブスター注射2週後から集卵を開始し、4週間卵を集めめた。なお、卵黄中の抗体価は4~6ヶ月間安定していた。その後、抗体価が低下したので、同様の方法で再注射したところ、元の抗体価のレベルまで回復した。

【0042】(3) 鶏卵卵黄中の抗体価の測定

免疫卵を割卵して卵黄を取り出した後、重量を計り、これに等量の生理的食塩水を加えて卵黄成分をよく溶解し、この混合物に対して等量のクロロホルムを加え、激しく振とう攪拌した後、遠心して上清を得た。この上清を抗体価測定用試料とした。抗体価の測定はELISAによって行った。方法は以下に示した通りであるが、固相化抗原並びにホースラディッシュペルオキシダーゼ-抗ニワトリ IgG コンジュゲートはチェックボードタイトレーションを行うことにより、至適濃度を設定した。プレートは96ウエルスループレートを用い、固相化にはHp全菌体可溶化抗原を用いた。抗原は蛋白量が5 μg/mlになるように炭酸緩衝液(pH9.6)で希釈し、1ウエル当たり100 μlずつ加え、+4°Cで18時間静置した。使用時にはPBS-Tweenで各ウエルを3回洗浄した後、ブロッキングのため2%スキムミルク溶液に200 μlずつ加え、37°Cで60分静置した。次に、各ウエルをPBS-Tweenで3回洗浄した後、各試料をウエル当たり100 μlずつ加え、37°Cで60分反応させた。反応後、再びPBS-Tweenで洗浄し、12,000倍に希釈したコンジュゲートを100

μl/ウエルに加え、再び37°Cで60分反応させた。ウエルを5回洗浄した後、基質(H₂O₂を含むO-フェニレンジアミン塩酸塩)を加えて室温で発色させ、20分後に50 μl/ウエルの3N H₂SO₄を添加して反応を停止させた。その後、各ウエルの吸光度(490nm)をELISAオートリーダーで測定した。試料の抗体価は最終的に陽性ならびに陰性対照の吸光度を基準にして補正して求めた。

【0043】(4) 鶏卵卵黄抗体の調製

免疫卵を水洗、消毒後、割卵機にて卵黄を分離し、8kgずつ小分けして使用時まで-20°C以下に保存した。精製は以下に示した方法により実施した。すなわち、卵黄7.5 kgを出発材料とし、卵黄重量に対し10倍量の精製水を加えて脱脂した。上清に40%飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて攪拌し、遠心によりペレットを得た。ペレットを生理的食塩水で溶かし、再び30%飽和塩析を行いペレットを得た。このペレットを少量の生理的食塩水で溶解し、これに最終濃度が50%になるように攪拌しながら、-20°Cに冷却したエタノールを徐々に加えた。遠心後、ペレットを生理的食塩水で溶かし凍結乾燥した。その結果、淡黄白色の粉末が約11g得られた。抗体の回収率は47%前後、IgG純度は95%以上、水分含量は2%以下であった。

【0044】

【実験例1】

Hp感染マウスを用いた各種鶏卵抗体の効力

この試験は、Hp感染に対して高感受性を示す通常ヘアレスマウス(NS:HR/ICR系)(財団法人動物繁殖研究所、受託番号 IAR-NHI-9701)を感染モデルとして用い、この感染モデルに抗全菌体鶏卵抗体(比較例)、抗ウレアーゼおよび抗鞭毛鶏卵抗体を連続経口投与することにより、胃粘膜に付着しているHpが除菌でき、胃炎の発生を有意に抑制できるかどうかを検討したものである。

【0045】ヘアレスマウス♂に臨床材料から分離したNSP 335株を 1×10^9 CFU経口的に3日間連続接種した。感染後8週目に表1に示したように、実施例1で調製した各種の鶏卵抗体を1日1回の割合で14日間強制経口投与した。投与終了時に各群のマウスを屠殺し、血清を採取し、Hpに対する抗体価をELISAによって測定した。また、剖検時に各群の胃を採取し、Hp菌数の測定並びに病理組織標本の作成に供した。Hpの胃粘膜への付着菌数は胃内容物を完全に除去した後、胃組織をPBS(pH7.2)で8回洗浄し、ホモゲナライズ処理した。得られた胃組織乳剤をHp検出用選択培地(ポアメデアHp分離培地、栄研化学)に接種した後、ガスパック法で37°C 5日間培養した。一方、胃組織はホルマリン固定の後、常法に従いヘマトキシリソ・エオジン重染色を行い、胃炎の有無を検討した。

【0046】その結果、表1に示したように、鶏卵抗体投与群は、用量依存的に胃内Hp菌数が減少する傾向を示した。抗全菌体抗体の投与でも、胃内Hp菌数を1/10程

11

度に減少させることはできるが、完全に除去することはできない。これに対して、抗鞭毛抗体および抗ウレアーゼ抗体投与群では、用量依存的に胃内 Hp 菌数が顕著に減少し、投与量 0.5 ml では略完全に除菌されている。このことは、ELISA により測定した血中抗体価からも裏付けられる。すなわち、投与群では用量依存的に低くなってしまっており、さらに抗全菌体抗体投与群に比べ、抗鞭毛抗体および抗ウレアーゼ抗体投与群での血中抗体価の減少は顕著である。

【0047】さらに注目すべきことは、抗全菌体抗体の投与では胃内菌数はある程度低下するものの胃炎の発生を抑制する効果は低く、わずかに投与量 0.5 ml における 1 匹を除きすべて陽性である。これに対し、抗鞭毛抗体および抗ウレアーゼ抗体の投与では、投与量 0.5 ml で全マウスの胃炎を抑制することができた。

【0048】以上のことから、Hp 感染マウスにおいて本*

*発明の鶏卵抗体投与による顕著な除菌効果および胃炎抑制効果が確認された。

【0049】前述の相場らの実験では、生後 4 週齢の無菌 BALB/c マウスに、臨床材料から分離した Hp #130 株を 1×10^9 CFU 経口的に 3 日間連続接種した。感染 4 ~ 7 週後に Hp 全菌体ホルマリン死菌に対する鶏卵抗体を 1 日 1 回 14 日間経口投与し、胃内の Hp 菌数を対照群のそれと比較した結果、Hp の抗全菌体抗体を連続投与することにより、対照群に比較して胃内 Hp 菌数を約 1/10 低下できることを示した。しかしながら、相場らの成績では、Hp の胃内菌数が 1/10 程度に低下したに過ぎず、完全除去菌まで至っていない。さらに胃炎発生の抑制効果に関しては記載がなく、効果があるとは認められない。

【0050】

【表 1】

Helicobacter pylori 感染マウスに各種鶏卵抗体を経口投与したときの効果

	抗体の種類	投与量 (ml)	胃内菌数 (Log10)/グラム	血中ELISA抗体価 (O.D. 値)	胃炎
比較例	抗全菌体抗体 (抗体価:2560)	0.5	4.22 ± 0.29** (5/5) ^b	0.78 ± 0.32 ^a	4/5 ^c
		0.25	4.62 ± 0.07 (5/5)	1.16 ± 0.23	5/5
		0.1	4.90 ± 0.10 (5/5)	1.32 ± 0.41	5/5
		0	5.08 ± 0.11 (5/5)	1.45 ± 0.37	5/5
本発明抗体	抗鞭毛抗体 (抗体価:2560)	0.5	0.68 ± 1.24*** (1/5)	0.03 ± 0.02***	0/5
		0.25	2.34 ± 1.76** (3/5)	0.25 ± 0.33**	3/5
		0.1	4.84 ± 0.24* (5/5)	1.09 ± 0.11	5/5
		0	5.44 ± 0.27 (5/5)	1.40 ± 0.29	5/5
	抗ウレアーゼ抗体 (抗体価:2560)	0.5	0 ± 0*** (0/5)	0.07 ± 0.07***	0/5
		0.25	0.76 ± 1.39*** (1/5)	0.12 ± 0.11***	0/5
		0.1	3.78 ± 0.36*** (5/5)	0.40 ± 0.12**	1/5
		0	5.08 ± 0.16 (5/5)	1.18 ± 0.28	5/5

a:標準偏差、

b:分母は使用匹数、分子は Hp 検出匹数、

c:分母は使用匹数、分子は胃炎陽性匹数

*: P<0.05

**: P<0.01

***: P<0.001

【0051】

【実験例 2】

Hp 感染マウスを用いた抗ウレアーゼ鶏卵抗体と抗鞭毛鶏卵抗体との併用効果

本実験は、ウレアーゼに対する鶏卵抗体と、鞭毛に対する鶏卵抗体を同時に投与した時の除菌の相乗効果を示すものである。

【0052】試験方法は基本的に実験例1と同じであるが、抗体の投与量はいずれも0.1mlとし、1日1回14日間投与した。対照群は滅菌生理食塩水を0.1mlずつ投与した。

【0053】表2に示した通り、単独で投与する抗体としては、ここでは抗体価2,560のものを用い、投与量0.1mlとした。この投与量では、抗ウレアーゼ抗体ではある^{*}【表2】

Helicobacter pylori 感染マウスに抗ウレアーゼ鶏卵抗体と抗鞭毛鶏卵抗体を併用して経口投与したときの効果の増強

抗体の組合せ	胃内菌数 (Log10)/グラム	ELISA抗体価 (O.D.値)	胃炎
抗鞭毛抗体 (2,560) ^a	4.38±0.28 ^b (5/5) ^c	1.20±0.15 ^b	5/5 ^c
抗ウレアーゼ抗体 (2,560)	3.74±0.33 ^{**} (5/5)	0.45±0.12 ^{**}	3/5
抗鞭毛抗体(640) + 抗ウレアーゼ抗体 (640)	0±0 ^{***} (0/5)	0.06±0.07 ^{***}	0/5
対照	5.00±0.27 (5/5)	1.21±0.16	5/5

a, b, c:表1参照

d :抗体価

** :P<0.01

*** :P<0.001

【0055】

【実験例3】

Hp感染マウスを用いた抗ウレアーゼ鶏卵抗体と乳酸菌との併用効果

Bhatia, S. J. ら (J. Clin. Microbiol., 27:2328-2330, 1999)は、インビトロの研究においてラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) が Hp の増殖を抑制すること、およびその抑制効果は乳酸によることを記載している。また、Midolo, P. D. ら (J. Appl. Bacteriol., 79:475-479, 1995) は、インビトロの系でラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・カセイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス・ブルガリカス (*Lactobacillus bulgaricus*)、ペディオコッカス・ペントサセウス (*Pediococcus pentosaceus*) およびビフィドバクテリウム・ビフィズス (*Bifidobacterium bi*

*る程度の菌数の減少と胃炎の抑制がみられるが、抗鞭毛抗体では菌数に对照群との有意差は認められず、胃炎の抑制効果もない。しかしながら、抗体価のさらに低い抗体価640の抗体を使用しても、抗鞭毛抗体と抗ウレアーゼ抗体とを併用することにより、完全な除菌効果が認められ、胃炎の発生も全マウスにおいて抑制された。このように抗鞭毛抗体と抗ウレアーゼ抗体との併用による相乗効果が認められる。

【0054】

fidus) が同様に Hp の増殖を抑制すること、その作用はこれらの菌によって產生される有機酸によることを報告しているが、いずれもインビトロの系での実験であり、実際の胃内の結果は予測できない。

【0056】また、前述の相場らは生後4週齢の無菌BALB/cマウス[♂]に臨床材料から分離した Hp #130 を 1×10^9 CFU 経口的に3日間連続接種し、感染4~7週後にヒト由来のラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) 1×10^8 CFU を3日間経口投与した。その4週後に屠殺し、胃内の Hp 菌数を対照群のそれと比較した。その結果、対照群の胃内菌数が 10^9 CFU/g であったのに対し、*Lactobacillus salivarius* 投与群では、感染4週後に投与した群で Hp 菌数が 10^2 ~ 10^3 CFU/g、感染6週後に投与した場合には、 10^4 CFU/g であったと報告している。

【0057】相馬らの成績は口腔、胃および腸管内に正常常細菌叢不在の無菌マウスを用いているため、正常常細菌叢を保有している通常マウスでも同じ結果が得られるかどうか非常に疑問である。すなわち、マウス固有の細菌叢を保有する通常マウスにヒト由来の乳酸菌を接種しても、マウス固有細菌叢がバリアとなって定着することはない。

【0058】この実験例3は、正常細菌叢を保有しているヘアレスマウスにヒト由来ラクトバチルス・アシドフィルス (JCM 1028) 単独投与群と、ウレアーゼに対する鶏卵抗体とL.アシドフィルスを併用した群を設定し、胃内におけるHpの除菌効果と胃炎発生との関連を検討したものである。試験方法は基本的に実験例2と同じである。なおL.アシドフィルスはブリッグスリバーブロースを用いて培養し、菌数の測定は光岡の方法(1979)によ*

Helicobacter pylori感染マウスに乳酸菌(*Lactobacillus acidophilus* JCM 1028)と抗ウレアーゼ鶏卵抗体を併用して投与したときの効果の増強

処置	胃内菌数 (Log10)/グラム	ELISA抗体値 (O. D. 値)	胃炎
<i>L. acidophilus</i> (1×10^9 CFU) ^d	4.72 ± 0.10^e (5/5)	1.17 ± 0.30^e	5/5 ^c
抗ウレアーゼ抗体 (2,560)*	$3.82 \pm 0.61^{**}$ (5/5)	$0.43 \pm 0.05^{***}$	3/5
<i>L. acidophilus</i> (1×10^9 CFU) ^d + 抗ウレアーゼ抗体(640)*	$0 \pm 0^{***}$ (0/5)	$0.03 \pm 0.02^{***}$	0/5
対照	5.24 ± 0.30 (6/6)	1.52 ± 0.34	5/5

a, b, c:表1参照

d :マウス当たりの投与菌数

e :マウス当たりの投与した抗体値

** : $P < 0.01$

*** : $P < 0.001$

【0061】

【実験例4】

Hp感染マウスを用いた抗ウレアーゼ鶏卵抗体と抗ウレアーゼ家兎血清抗体の除菌効果の比較

この実験は、鶏卵抗体が哺乳動物由来の抗体よりも Hp の除菌効果が高いことを示すものである。

【0062】すなわち、抗ウレアーゼ鶏卵抗体と抗ウレアーゼ家兎血清抗体を用いて、Hpの除菌効率を比較検討した。試験方法は実験例2と基本的に同じである。抗体投与量は0.1 mlとし、1日1回14日間の連続投与をし

*り実施した。投与菌数は 1×10^9 CFUとし、1日1回14日間連続して投与した。

【0059】その結果、表3に示したように、L.アシドフィルス単独投与群では胃内Hp菌数は対照群のそれとほとんど同じであり、両群に有意差は認められなかった。また、胃炎病変も確認され効力は認められなかった。この点は相馬らの無菌マウスを用いた成績とは著しく異なる。このように正常細菌叢を保有するマウスでのHp除菌効果および胃炎抑制効果は認められない。しかしながら、L.アシドフィルスと抗ウレアーゼ鶏卵抗体を併用して14日間投与した群では、胃内Hpがほとんど除菌され、かつ胃炎病変は検出されなかった。なお、併用した抗体は力価640のものである。

【0060】

【表3】

た。

【0063】その結果、表4に示したように、マウス当たり投与した抗体の力価は両群とも同じであったにもかかわらず、鶏卵抗体投与群のみが胃内のHpを完全に除菌し、胃炎の発生も抑制した。これに対し、家兎由来抗ウレアーゼ抗体投与群では、胃内Hp菌数がやや低下する程度であった。また、胃炎の軽減は全く認められなかつた。このように、受動免疫療法によるHp除菌の効果に関して、意外にも同じ哺乳動物由来の抗体よりも、異種抗体である鶏卵抗体の方が優れていることが判明した。

【0064】なお、鶏卵抗体のみならず、家兎血清由来抗体とも、ウレアーゼを抗原として免疫して得られた抗体であるにもかかわらず、精製ウレアーゼの酵素活性を*

Helicobacter pylori 感染マウスに鶏卵黄由来抗ウレアーゼ抗体又は
家兎血清由来抗ウレアーゼ抗体を経口投与したときの効果の比較

*ほとんど中和しなかった。

【0065】

【表4】

抗体の由来	胃内菌数 (Log10)/グラム	ELISA抗体価 (O.D.値)	胃炎
鶏卵黄 (2,560) ^a	0±0*** (0/5) ^b	0.03±0.01***	0/5 ^c
家兎血清 (2,560) ^d	4.56±0.28 (5/5)	0.53±0.23*	5/5
対照	5.10±0.31 (5/5)	1.30±0.16	5/5

a, b, c, d:表2参照

* : P<0.05

*** : P<0.001

【0066】

【実験例5】

精製Hpウレアーゼのラット胃ムチンへの特異的結合

前述のように従来の研究結果からは、Hpのウレアーゼは胃内の尿素をアンモニアに変換することにより、本菌が定着している部位のpHを中性とし、胃内で増殖するためのよい環境を提供するのに役立つと考えられていた。また、Eaton K. A. らの研究およびClyne M. らの研究から、胃粘膜へのHpの定着に関し、Hpのウレアーゼは付着因子としての機能は持たないことが結論づけられた。

【0067】しかしながら、上記実験例1の実験において、抗ウレアーゼ鶏卵抗体は他の抗原に対する抗体よりも胃内に定着しているHpを最も効率よく除菌でき、胃炎の発生を顕著に抑制した。さらに、Hp攻撃に対する抗体価の上昇も抑制された。この実験から、Hpのウレアーゼが最も重要な病原因子であることが示唆される。

【0068】本発明者らはさらに、Hpのウレアーゼが胃粘膜への付着因子として機能するかどうかをインビトロ実験で精製ウレアーゼを用いて検討した。その結果、図1に示したように、ウレアーゼは用量依存的にラット胃ムチンに付着した。次に、ムチン糖タンパクにおけるウレアーゼの結合部位を推定するために、図2に示した実験を行ったところ、ウレアーゼの結合部位はムチンのスルファチドであることが示唆された。

【0069】また、鶏卵抗体について、Hpのヒト胃癌MK N 45細胞への付着阻止に関する検討したところ、Hpの

付着阻止能は抗ウレアーゼ抗体が最も高く、次に抗鞭毛抗体であった(図3)。精製鞭毛がラット胃ムチンに特異的に付着するかどうかについてはまだ確認されていないが、Hpの鞭毛が付着に関与していることは十分考えられる。

30 【0070】なお、前述のように、抗ウレアーゼ鶏卵抗体は精製ウレアーゼの酵素活性をほとんど中和せず、抗ウレアーゼ家兎抗体でも同様であった。

【0071】以上のことから、Hp感染マウスにおいて抗ウレアーゼ鶏卵抗体が最も高い除菌効果を示したのは、この抗体が菌体表面ウレアーゼと特異的に結合し、Hpが胃ムチンに付着するのを抑制するためと考えられる。すなわち、Hpのウレアーゼは胃ムチンに対する付着因子としての機能を有する。

【0072】

40 【発明の効果】以上より明らかのように、本発明によれば、ヘリコバクター・ピロリ感染によって引き起こされる胃炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍に対して、安全で効果的な予防剤および治療剤、並びに予防用食品を提供することができる。本発明の抗体含有組成物は、ヘリコバクター・ピロリの胃内での定着に関与する因子を見出したことにより得られたものであるので、胃内のヘリコバクター・ピロリを完全に除菌することができ、従って、胃炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍を有効に抑制することができる。しかも、本発明では鶏卵を利用して抗体を得るので、簡便な手段で多量、かつ安価に目的の特異的抗

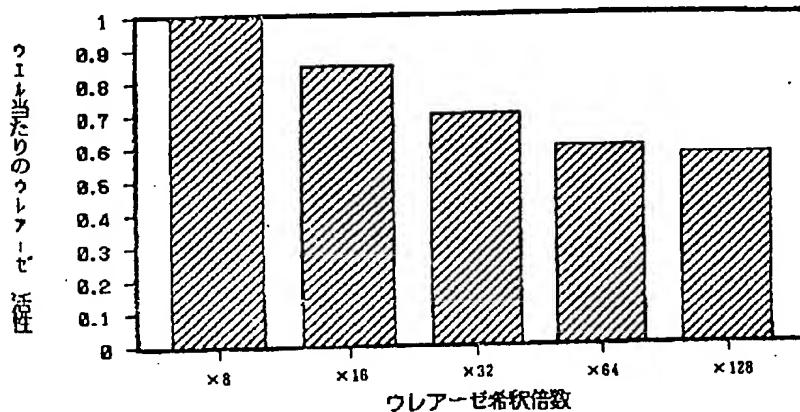
体を製造できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 Hpウレアーゼがラット胃ムチンに濃度依存的に結合することを示す図である。

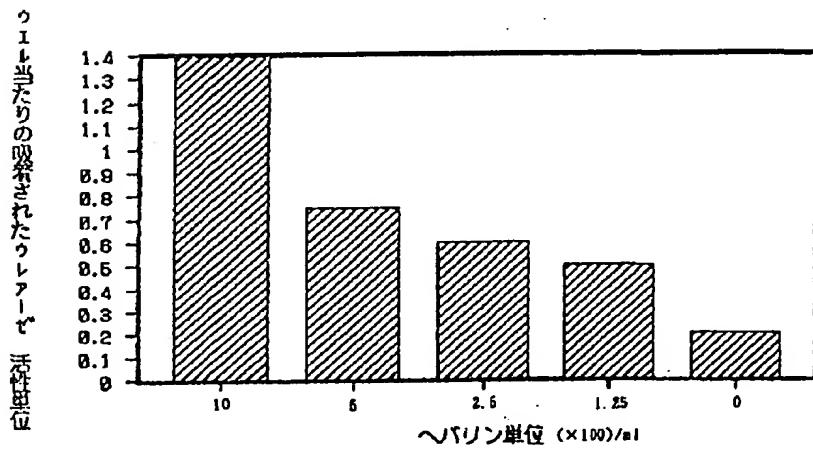
【図1】

Hpウレアーゼのラット胃ムチンへの付着性

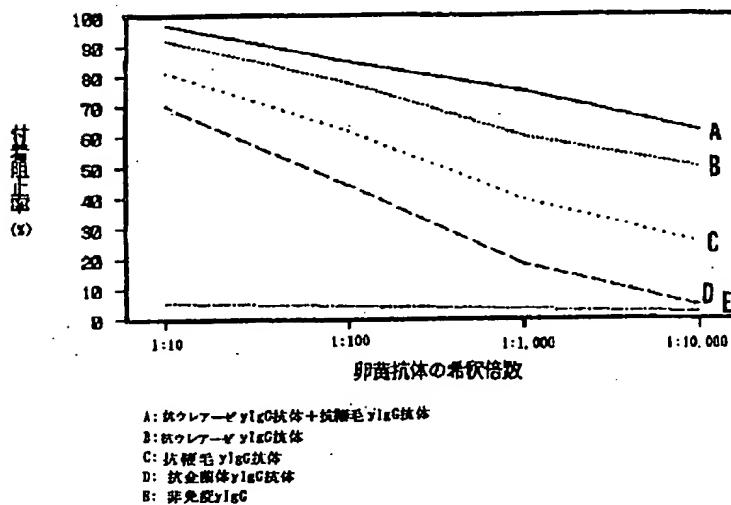


【図2】

ヘパリンで前吸着されたラット胃ムチンへのウレアーゼの付着性



【図3】

各種卵黄抗体による $\text{Helicobacter pylori}$ のヒト胃癌細胞への付着阻止効果

フロントページの続き

(72)発明者 木村 修武

埼玉県入間郡大井町鶴ヶ岡5丁目3番1号
日清製粉株式会社ファインケミカル研究
所内

(72)発明者 有賀 正人

埼玉県入間郡大井町鶴ヶ岡5丁目3番1号
日清製粉株式会社ファインケミカル研究
所内